

**Aus dem Anatomischen Institut  
der Johannes - Gutenberg - Universität Mainz**

**Über die histochemischen Untersuchungen  
der Polysaccharide im Knorpel und Knochen**

**Inaugural - Dissertation**

**zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde der Hohen  
Medizinischen Fakultät der Johannes Gutenberg -  
Universität zu Mainz**

**vorgelegt von**

**Nayyere Haririan**

**aus Medched / Iran**

**1964**







**Aus dem Anatomischen Institut  
der Johannes - Gutenberg - Universität Mainz**

**Über die histochemischen Untersuchungen  
der Polysaccharide im Knorpel und Knochen**

**Inaugural - Dissertation**

**zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde der Hohen  
Medizinischen Fakultät der Johannes Gutenberg -  
Universität zu Mainz**

**vorgelegt von**

**Nayyere Haririan**

**aus Meched / Iran**

**1964**

**DEKAN:** Professor Dr. med. K. Thomsen

**REFERENT:** Professor Dr. med. M. Watzka



INHALTSÜBERSICHT

|                                                                               | Seite |
|-------------------------------------------------------------------------------|-------|
| I Einleitung                                                                  | 1     |
| II Histochemischer Kohlehydratnachweis                                        | 2     |
| III 1) Allgemeines über die Zusammensetzung<br>der Knorpelgrundsubstanz       | 3     |
| 2) Histogenese des Knorpels                                                   | 4     |
| 3) Das reife Knorpelgewebe                                                    | 5     |
| a) Grundsubstanz                                                              | 5     |
| b) Knorpelzellen                                                              | 8     |
| c) Perichondrium                                                              | 9     |
| 4) Histochemische Veränderungen des<br>Knorpels bei pathologischen Prozessen. | 10    |
| IV Knochengewebe                                                              | 12    |
| 1) Histogenese des Knochengewebes                                             | 12    |
| a) Theorie der Verkalkung                                                     | 12    |
| b) Desmale Ossifikation                                                       | 13    |
| c) Osteoblasten und Osteoklasten                                              | 15    |
| d) Enchondrale Ossifikation                                                   | 15    |
| α) Zellen                                                                     | 15    |
| β) Grundsubstanz                                                              | 16    |
| 2) Reifes Knochengewebe                                                       | 19    |
| a) Osteocyten                                                                 | 19    |
| b) Grundsubstanz                                                              | 19    |
| c) Periost                                                                    | 21    |

|   |                                                                                                                |     |
|---|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| V | Histochemisches Verhalten des Knochens bei pathologischen Veränderungen und unter experimentellen Bedingungen. | 22  |
|   | Literatur                                                                                                      | 24. |

## I Einleitung

Die Methoden der Histochemie haben das Ziel, chemisch bekannte Substanzen in Zellen und Geweben nachzuweisen und zu lokalisieren.

Die Histochemie bildet eine Verbindung zwischen Histologie einerseits und den Methoden der Chemie andererseits.

In der hervorstehenden Abhandlung soll über das Vorkommen von Kohlehydraten in Knorpel und Knochen berichtet werden.

Die Aussagen werden mehr qualitativer und histotopochemischer Natur sein.

In Anlehnung an die Biochemie können folgende histochemisch erfassbare Polysaccharide unterschieden werden:

1. Einfache Polysaccharide die als Polymerisationsprodukte von einfachen Zuckern aufgefasst werden können wie z.B. Glykogen.
2. Mukopolysaccharide, von denen wieder neutrale und saure Mukopolysaccharide unterschieden werden können.

Neutrale Mukopolysaccharide sind Polymerisationsprodukte von Aminoazuckern. Die sauren Mukopolysaccharide besitzen noch Bausteine mit Säuregruppen wie z.B. Glukuronsäure und Galakturonsäure oder Schwefelsäure. Sie sind im wesentlichen Bestandteile der Knorpelgrundsubstanz und kommen ebenfalls in Schleimstoffen und im Heparin vor.

3. Mukoglykoproteide, die sich von den Mukopolysacchariden durch ihre feste Bindung an Proteine unterscheiden.
4. Glykolipide, die Komplex-Verbindungen von Fettsäuren mit stickstoffhaltigen Basen und Zuckern darstellen.

## II Histochemischer Kohlehydratnachweis:

Einfache Polysaccharide sind in verschiedenem Maße wasserlöslich. Damit kann ein Verlust eintreten, wenn mit wässrigen Fixierungsmethoden gearbeitet wird. Daher müssen wasserfreie bzw. wasserarme Konservierungsmethoden verwendet werden. Ein Nachteil besteht weiter, daß die Lokalisation des Glykogens nicht mehr dem ursprünglichen Vorkommen entspricht. Es ist weiter zu berücksichtigen, daß Kohlehydrate leicht fermentativ abgebaut werden, was besonders für das Glykogen gilt. Daher ist auch auf diesem Wege mit Verlusten zu rechnen, der durch Fixierung bei kalten Temperaturen im Eisschrank herabgesetzt werden kann.

Eine weitere Fehlerquelle, die zu einer falschen Lagerung des Glykogens führt, ist die Alkohol-oder Glykogenflucht, worunter die Erscheinung verstanden wird, daß Glykogen in den Zellen an den Stellen abgelagert wird, die dem eindringenden Fixierungsmittel gegenüberliegen.

Wie bei fast allen histochemischen Reaktionen gibt es auch für die Kohlehydrate keinen hundertprozentigen spezifischen Nachweis, und die Ergebnisse müssen durch die Kontrollversuche gesichert werden.

Ohne auf die Durchführung der zahlreichen histochemischen Methoden zur Polysacchariddarstellung näher einzugehen, sollen folgende als die wichtigsten angeführt werden:

Für den allgemeinen Nachweis sind die Perjodsäure-Schiff (P A S), die Bleitetraazetat-Schiff (B T S) und die Chromsäure-Schiff (Ch S) die wichtigsten.

Für den Glykogennachweis dient die Best'sche Karminfärbung und die Bauer'sche Polysaccharid-Reaktion.

Saure Mukopolysaccharide werden durch Metachromasie in wässriger 0,5%iger Toluidinblaulösung, durch den Basophilietest in Methyl-enblaulösung, meistens mit dem Hyaluronidasetest, mit der Hale-Reaktion und durch Alcianblaufärbung nachgewiesen.

### III 1. Allgemeines über die Zusammensetzung der Knorpelgrundsubstanz

Die Grundsubstanz des hyalinen Knorpels enthält nach den älteren Angaben 40% Chondroitinschwefelsäure (WINTER 1932), nach neueren Angaben jedoch nur 25% (K. MEYER 1950 c, 1954). Ein gutes Maß für den Mucopolysaccharidgehalt ist die Glucosaminkonzentration; diese beträgt nach STARY und BILEN (1956) im Knorpel 0,84% der Proteinfraction.

Der Mucopolysaccharidgehalt des Knorpelgewebes ist nach Alter, Spezies und Lokalisation verschieden. Die Mucopolysaccharide des Knorpels nehmen mit Zunahme des Alters ab (SYLVEN); Die Konzentration im kindlichen Nasen-Knorpel ist 40% und im Rippenknorpel 4,8% (SYLVEN 1947 a, 1948b).

Vom Alter ist auch die chemische Zusammensetzung der Knorpelgrundsubstanz abhängig. Während der Glucuronsäuregehalt mit dem Alter zunimmt, nimmt der Hexosamingehalt ab (SCHETLAR und MASTERS 1955).

Die Viskosität des extrahierbaren Chondromucoids nimmt mit dem Alter ab, während das Verhältnis Sulfat-Glucosamin offenbar konstant bleibt (RIZZOLI und MASTROBUONO 1955).

Die Proteinzusammensetzung des Knorpels, des Knochens und des Bindegewebes sind sehr ähnlich (FOLLIS 1952). Die Ansichten über die Bindungen zwischen Mucopolysacchariden und Protein sind verschieden. Nach BLIX (1940); PARTRIDGE (1948); K. MEYER (1952b,c, 1954) ist die Bindung teilweise polar dissoziierbar. Nach SCHATON und SCHUBERT (1954) soll es sich dabei um zwei elektrophoretisch nur gering unterschiedliche Fraktionen handeln.

Nach BARCROFT (1944); BACSICH und RIDDELL (1955) können die Mucopolysaccharide als Teilstrukturen des avasculären Stoffaustausches angesehen werden.

CAMPBELL und PERSON (1951); DAVIES und YOUNG (1954); PELC und GLÜCKSMANN (1955) haben durch autoradiographische Untersuchungen eine beachtliche Stoffwechselaktivität der Knorpelgrundsubstanz nachgewiesen. Der Sulfatumsatz des Knorpelgewebes ist hormonabhängig und durch Cortisonbehandlung wird er herabgesetzt (BOSTRÖM und ODEBLAD 1953b).

## 2. Histogenese des Knorpels:

Vor dem Manifestwerden der morphologischen Merkmale des Knorpels sind charakteristische Unterschiede nachzuweisen, die auf eine histochemische Differenzierung hinweisen (V. WELL 1948).

Die chondrogenetischen Areale sind vorher durch ihren intracellulären Glykogengehalt zu erkennen (GRAUMANN 1953c); Auch chondrogenetische Blasteme sind vorher schon auf Grund ihrer Metachromotropie bzw. Perjodatreaktivität zu erkennen. (HOLMGREN 1939, 1940; MOSCONA und MOSCONA 1952a).

Außerdem ist es möglich, auf Grund scharfer Unterschiede im Glykogengehalt innerhalb morphologisch einheitlich chondrogenetisch erscheinenden Zellverdichtungen eine frühere gewebliche Gliederung nachzuweisen (GRAUMANN 1953c).

Das Glykogen scheint zuerst mit der Grundsubstanzbildung zuzunehmen, um dann mit der weiteren Differenzierung abzunehmen, sowohl in dauernd bestehenden, wie auch in vorübergehenden Knorpelbildungen.

SUNDBERG (1924) beschrieb, daß in den menschlichen Knorpeln der Nase, Trachea und Larynx genau soviel Glykogen vorkommt, wie in allen anderen Knorpeln, während nach Behauptungen von PRETO PARVIS (1941) der Ohrknorpel und Nasenknorpel besonders reich an Glykogen sein sollen.

Die Metachromotropie und Eisenbindungsreaktion der Grundsubstanz beginnen vor dem Verknorpelungsstadium und gehen mit einer R.N.S. Anreicherung in den Zellen parallel (PRETO PARVIS und RONCORONI 1951).

Die Metachromotropie der Knorpelgrundsubstanz wird mit weiterer Differenzierung des Knorpels stärker (RIZZOLI und MASTROBUONO 1953), die in Strängen und Netzen zwischen den Zellterritorien auftreten (HOLMGREN 1939).

Die fetale Knorpelgrundsubstanz zeigt mit Alcianblau keine Metachromotropie (RIZZOLI 1955), die auf eine Depolymerisationsabweichung gegenüber des reifen Knorpelgewebes zu beziehen ist (SYLVEN 1947a und 1948b).

Der Sulfatumsatz im fetalen Knorpel ist nach autoradiographischen Untersuchungen sehr groß (FRIBERG und RINGERTZ 1954b).

Diese Intensität ist besonders in den mittleren Zonen der Knorpelstücke zu sehen. Durch diese Methode kann man auch lokale Unterschiede in der Wachstumsintensität des fetalen Knorpels nachweisen (AMPRINO 1955b).

Interessante Beziehungen bestehen zwischen Basophilie der Grundsubstanz und Aufnahme von Radiosulfat; Erstere gibt Auskunft über den Bestand der freien elektronennegativen Gruppen, während die Letztere ein Momentbild der synthetischen Leistung darstellt. GRAUMANN (1952a) hat eine Perjodatreaktivität in den 5 mm langen Mäuseembryonen nachgewiesen, während FAWNS und LANDELLS (1953) diese nicht nachweisen konnten, was auf einen großen Polymerisationsgrad der Grundsubstanz hindeutet. Andere Untersuchungen (GRAUMANN 1952a; SEO 1955; RIZZOLI und MASTROBUONO 1953) haben eine Perjodatreaktivität des Vorknorpelblastens beschrieben.

### 3. Das reife Knorpelgewebe:

#### a) Grundsubstanz

Die Grundsubstanz des hyalinen- sowie des elastischen- und Faserknorpels ist durch die Perjodatreaktion darstellbar (SEO 1953).

GRAUMANN (1953b) stellte fest, daß perjodatnegative Stellen der reife Knorpelgrundsubstanz mit Bleitetraacetat reaktionsfähig werden, die nach seiner Ansicht durch Depolymerisation von a-Hydroxysäure-Gruppen der Mucopolysaccharide zustandekommen. Diese Perjodatreaktivität wird durch Parathormoneinwirkung verstärkt (ENGEL 1952a). Metachromotropie und Perjodatreaktivität verhalten sich umgekehrt (FAWNS und LANDELLS 1953). Die Metachromotropie nimmt mit dem Absinken der Polymerisation ab, während die Perjodatreaktivität zunimmt.

Die Metachromotropie beruht auf den hohen Gehalt von elektronegativen Ladungen der Polysaccharid-Sulfategter, und dementsprechend ist die Knorpelmatrix basophil; das pH Optimum dafür ist 1,3 (DEMPSEY et al. 1947; LILLIE 1949a), und das pH Minimum ist 1,0 (HAYASHI et al. 1955a).

Die Knorpelgrundsubstanz zeigt auch wegen der Basophilie eine positive Polysaccharideisenreaktion (WOLMAN 1956b; JOEL et al. 1956; GEYER 1957), eine positive Aldehydfuchsinreaktion (SCHAJL

OWICZ und CABRINI 1955) und auch eine positive Alcianblaureaktion (LISON 1954; RIZZOLI und MASTROBUONO 1955).

Die Grundsubstanz des elastischen Knorpels ist besonders durch Alcianblau darstellbar (RIZZOLI 1955b), während die des hyalinen mehr eisenbindend ist (GEYER 1957).

Wenn der Sulfateinbau in der Knorpelmatrix erhöht wird, sind Metachromotropie (FRIBERG und RINGERTZ 1956) und die Alcianblaureaktion (CURRAN und KENNEDY 1955b) stärker. Diese Resultate sind durch autoradiographische Untersuchungen festgestellt worden (ODEBLAD und BOSTRÖM 1952). Die Testishyaluronidase schwächt die Metachromotropie ab und die Basophiliekuve wird gesenkt (LAVES 1948a,b), was durch eine Verschiebung des isoelektrischen Punktes nach der alkalischen Seite hin hervorgerufen wird, die durch Abbau der Mucopolysaccharide bedingt ist, und autoradiographisch zu bestimmen ist (BELANGER 1954; CURRAN und KENNEDY 1955b).

Die Perjodatreaktivität bleibt wesentlich länger erhalten (CASTIGLIONI 1949/1950; YATES und PAGET 1952; AKAMINE et al. 1954; SCHAJOWICZ und CABRINI 1955).

Der Knorpel im Bereich der Sehnenansätze, sowie der verkalkte Knorpel werden nicht durch Hyaluronidase beeinflusst (FAWNS und LANDELLS 1953); es kommt auch zu keinen Veränderungen der Knorpelgrundsubstanz mit Streptohyaluronidase (ROBERTSON et al. 1940).

Pepsin und Trypsin haben keinen Einfluß auf Metachromotropie der Knorpelmatrix (SCHAJOWICZ und CABRINI 1955), während Speichel nur die Perjodatreaktivität beeinflusst (SEO 1953).

Durch Säuren werden Metachromotropie und Perjodatreaktivität gemindert, besonders stark durch Salpeter- und Schwefelsäure, während die Perchlorsäure nur eine geringe Senkung derselben verursacht (SCHAJOWICZ und CABRINI).

Die Kollagenasepräparate bringen die Fasern der Grundsubstanz zur Auflösung (AKAMINE et al. 1954).

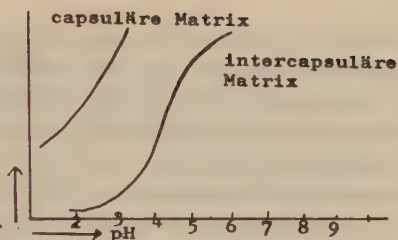
Die einzelnen Knorpelstücke derselben Individuen, auch verschiedene Stellen der gleichen Knorpelstücke verhalten sich histochemisch verschieden. Die Basophilie der capsulären Matrix ist stärker als die interterritoriale Grundsubstanz.

Bei einem pH zwischen 1,5-3 wird nur die Kapselmatrix chromotrop. (DEMPSEY und SINGER 1946; WISLOCKI et al. 1947a).

Auch die Knorpelmatrix zeigt wegen ihres elektronegativen Charakters auch eine verstärkte Eisenbindung (GEYER 1957) und eine stärkere Blaubindung durch die Bi-Col-Methode (WOLMAN 1956b).

Das gleiche Verhalten zeigt die subperichondrale Schicht (RIZZOLI und MASTROBUONO 1953) und die Wandung der Gefäßkanäle im jungen Knorpel (PISCHINGER 1926).

Die gleiche Abstufung der Basophilie bei der Färbung gilt auch für Aldehydfuchsin- und Alcianblau-Färbung (LISON 1954; RIZZOLI 1955a; SCHAJOWICZ und CARRINI 1955). Die Perjodatreaktivität ist subperichondral und im Bereich der Knorpelkapsel stark ausgebildet, während im Bereich des Zentrums reaktionlose Stellen zu sehen sind (GLEGG et al. 1952; GRAUMANN 1953b). Im allgemeinen sind die Meinungen über die Intensitätsabstufung der Perjodatreaktivität verschieden. AKAMINE et al. (1954) nennen folgende Reihenfolge der Intensität der Perjodat-Leukofuchsinreaktion: Innere und äußere Oberfläche der Intermediärzone - Zentralzone - ovalzellige Schicht der Peripherie. Die Matrix der Intermediärzone selbst zeigt viele reaktionlose Areale. Das histochemische Verhalten der Matrix ist vom Alter abhängig. Während die Metachromotropie mit der Alterszunahme abnimmt, nimmt die Perjodatreaktivität dagegen zu. Die Veränderungen der Perjodatreaktivität ist am menschlichen Rippenknorpel von CANEPA (1956a) untersucht worden: Die Perjodatreaktivität tritt erst nach der Geburt auf und nimmt bis zum 19. Lebensjahr zu. Vom 19. bis 37. Lebensjahr zeigt die Matrix eine regelmäßige Reaktivität, ab 37. bis 50. Lebensjahr eine stärkere Intensität der Territorien, ab 50. bis 70. Lebens-



Kurve der Basophilie der Knorpelgrundsubstanz im Trachealknorpel der Ratte.- Umzeichnung nach Dempsey und Singer 1946.

Jahr eine stärkere fleckige Reaktivität und gleichzeitige degenerative Veränderung der Matrix. Nach LOEWI (1953); RIZZOLI und MASTROBUONO (1955) sind diese Veränderungen durch eine Depolymerisation der Matrix verursacht, die durch folgende biochemische Erklärung zu stützen ist: Während der Schwefel-Hexosamin-Index vom Neugeborenen bis zu einem Alter von 68 Jahren von (5 auf 1,6) abnimmt, nimmt der Perjodatverbrauch pro 100 mg von (14,4 auf 60,0) zu. Nach LOEWIE (1955) nimmt die Verkalkung des Knorpelgewebes mit zunehmendem Alter zu, die auf eine Depolymerisation zurückzuführen ist. Nach dem Tode nimmt die Basophilie besonders im Gelenkknorpel von der Peripherie zum Zentrum hin ab (DETMER et al. 1956). Die Perjodatreaktivität bleibt im Zentrum der Knorpelstücke nach dem Tode erhalten (CANEPÀ 1956b).

#### b) Knorpelzellen

Das Cytoplasma der Knorpelzellen enthält Glykogen und ist nach NEUMANN (1877) in jedem Lebensalter vorhanden. Quantitativ liegt die Menge des Knorpelzellglykogens dicht hinter dem Leber- und Muskelzellglykogen (MONTAGNA 1949). Das Glykogen ist perinuclear gelagert, was eine Beeinflussung der Polysaccharidbildung durch den Kern hinweist (GUIZETTI 1910; GENDRE 1938b). Das Glykogen liegt nicht in gelöster Form vor, wie EHRLICH (1883) annahm, sondern in fein granulierter Form (COUTEAUX-BARGETON 1950). Die embryonalen Knorpelzellen der Peripherie enthalten weniger Glykogen als im Zentrum (GIERKE 1905; GUIZETTI 1910). GUIZETTI hat das Verhalten des Glykogens des Trachealknorpels des Menschen untersucht und beschreibt folgendes: Im fetalen Alter tritt Glykogen zentral auf; ab 4. Lebensjahr ist das Glykogen im Zentrum verschwunden, während es am Rande bis zum höchsten Lebensalter erhalten bleibt. Das Glykogen der Knorpelzellen weist hier eine große Resistenz auf, was durch Konstantbleiben desselben bei amitotischen Teilungen (MONTAGNA 1949) und

experimentellen Diabetes (FICHERA 1904) bewiesen wird. Bei langen Hungern scheint die Glykogenmenge abzunehmen, aber viel langsamer als beim Leber- und Muskelzellglykogen (RABE 1910; GUIZETTI 1910; ARNDT 1928). Das Knorpelzellglykogen wird in 1%iger Enzymlösung (in Wasser bei Zimmertemperatur) sehr langsam hydrolisiert, während das Leber- und Muskelzellglykogen in dieser Zeit ganz heraus eliminiert wird (GRAUMANN). Das Knorpelzellglykogen ist in dieser Zeit gegen Salpeter- und Salzsäure resistent (SCHAJOWICZ und CABRINI 1955, 1956), während es nach dem Tode ziemlich rasch verschwindet (FOLLIS 1949b).

Die biologische Bedeutung des Knorpelzellglykogens ist nicht die Fettsynthese, sondern ist eine Reserve (GUIZETTI und ZACCARINI 1910). Die Knorpelzellen enthalten außerdem eine metachromotrope Substanz, die mit Alcianblau- und Eisenfärbungen dargestellt wird (FOLLIS und BERTHRONG 1949; GEYER 1957; KENNEDY und CURRAN 1955b).

In den Knorpelzellen kommen noch acidophile Körperchen vor, die aus Mucoproteiden bestehen und auf eine intercelluläre Chondroitinsulfatbildung hinweisen (BELANGER 1954b; AMPRINO 1955b; GIBSON et al. 1955). Das Chondroitinsulfat der Knorpelgrundsubstanz wird intracellulär gebildet, was durch die folgende Erklärung unterstützt wird: Eine normale Zusammensetzung der Matrix ist von funktionstüchtigen Zellen abhängig; im Alter, wenn die Zellzahl abnimmt, sieht man auch eine Minderung des Chondroitinsulfats der Matrix (HASS 1943). FOLLIS (1952) hat erklärt, daß im nativen Gefrierschnitt nur in unmittelbarer Zellumgebung eine Metachromotropie nachzuweisen ist. Der Sulfatumsatz ist in den Knorpelzellen höher als in der Knorpelgrundsubstanz (CURRAN und KENNEDY 1955). Diese Fähigkeit ist an die lebenden Chondrocyten gebunden.

#### c) Perichondrium:

Das Perichondrium ist schwach Perjodatreaktiv und dadurch hebt es sich gut gegen die subperichondrale Knorpelschicht ab (RI-

ZOLLI und MASTROBUONO 1953). Die Zellen des Perichondriums besitzen kein Glykogen (NEUMANN 1877; RABE 1910; GENDRE 1938b; PRITCHARD 1952; AKAMINE et al. 1954).

Das Perichondrium hat auch eine metachromatische Reaktion (HOLMGREN 1939, 1940).

#### 4. Histochemische Veränderungen des Knorpels bei pathologischen Prozessen.

Das Glykogen fehlt bei allen progressiven Vorgängen des jungen Knorpelgewebes (ZACCARINI 1911); es fehlt auch bei proliferierenden Geweben des ausheilenden Knorpels (MCMANUS 1954). Die Matrix des proliferierenden Gewebes zeigt auch eine verstärkte Metachromotropie bzw. Eisenbindungsreaktion und eine schwache Perjodatreaktivität.

Bei A-Hypervitaminose kommt es zu einer Abnahme der Basophilie und Metachromotropie der Matrix, die auf eine Depolymerisation zurückzuführen ist (FELL und MELLANBY 1952).

Vitamin-C-Mangel äußert sich auch in einer Verminderung der Metachromotropie, die in einer Störung der intercellulären Synthese der Mucopolysaccharide liegt (A. MEYER 1944).

Diese histochemischen Veränderungen äußern sich besonders an den oberflächlichen Knorpelpartien, aber sie sind unabhängig von den mechanischen Belastungen (CAMURATI und TESSAROLO 1953). Die chondromalacischen Veränderungen äußern sich histochemisch in einer Abnahme der Metachromotropie, die herdförmig erscheint (KELLGREN 1952) und durch ein vollkommenes Verschwinden der Perjodatreaktivität (FISCHER-WASELS 1952).

Bei Asbestveränderungen kommt es zu einer Schwächung der Metachromotropie- und Bleitetraacetat- und Leukofuchsinreaktion. Bei den entzündlichen Prozessen der Gelenkknorpel ist ein Schwund der Metachromotropie nachzuweisen (SYLVEN 1947c, 1948a), die auf eine lokale Alkalisierung zurückzuführen sind.

Der Knorpel bei congenitaler Syphilis ist orthochromotrop, was auf einen Abbau der Chondroitinschwefelsäure durch die Spirochäten hinweist (FOLLIS 1949b).

Die chondrogenetischen Blasteme enthalten auch Glykogen (NEUMANN 1877; LANGHANS 1890); dieses ist aber in Chondroblasten enthalten, nicht aber in proliferierenden Zellen von Chondrosarkom (FORANKER und MARINO 1956b).

Die Matrix des Chondrosarkoms ist unregelmäßig metachromotrop (SCHAJOWICZ und CABRINI 1954a).

Bei primären und sekundären sarkomatösen Veränderungen der Knorpel kommt es zuerst zur Abnahme und anschließend zum Verschwinden der Metachromotropie; nur die perizelluläre Höfe bleiben von diesen Veränderungen unberührt (SYLVEN 1947c).

#### IV Knochengewebe

- 1) Histogenese des Knochengewebes.
- a) Theorie der Verkalkung.

Die Mineralisation des Knochengewebes erfolgt nach bestimmten topographischen Zuordnungen, die durch alkalische Phosphatase bedingt wird (ROBISON 1923). Durch lokale Einwirkungen der alkalischen Phosphatasen entsteht ein lokaler Überschuß an Phosphationen, die bei vorhandenen Ca-Ionen als Mineralstoffe ausfallen. Da aber dieser einfache Mechanismus durch Gifte, wie Fluorid oder Cyanid gehemmt wird (ROBISON und ROSENHEIM 1934), denkt man auch an das Vorliegen eines enzymatischen „second mechanism“.

Die Quelle der organischen Phosphate für diesen Mechanismus ist Glykogen (ROUGET 1859a; HOFFMANN et al. 1928; GLOCK 1940; FOLLIS und BERTHRONG 1948, 1949; BEVELANDER und JOHNSEN 1951), durch dessen Abbau Hexosephosphorsäure entsteht, deren Ester dann als Substrat der alkalischen Phosphatase gebraucht wird (HARRIS 1932a,b). Diese Behauptung wird verifiziert durch den Nachweis der Phosphorylaseaktivität im Epiphysenknorpel (GUTMAN und YÜ 1950; GUTMAN et al. 1942).

Das Substrat-Enzymsystem stellt eine Komponente des lokalen Faktors der enchondralen Verknöcherung dar, und leitet die Phosphatübertragung auf die zu mineralisierende Matrix ein. PRITCHARD (1952) behauptete, daß nur in verkalkenden Geweben Glykogenolyse und Phosphataseaktivität in ihren topographischen Verteilungen übereinstimmen.

Für die Mineralisation der Gewebe sind folgende Faktoren nötig:

- 1) Mineralspiegel in Gewebssäften.
- 2) Glykogen und Fermente.
- 3) Vitalität der hypertrophen Knorpelzellen und ihre

spezifisch verbreiteten interzellulären Substanzen (FOLLIS und BERTHRONG 1949; GUTMAN 1950; RUBIN und HOWARD 1950; SOGNAES 1955).

Die Aufgabe der Grundsubstanz ist gut zu verstehen, wenn man die Verkalkung der hypertrophen Epiphysenknorpels durch Zusatz von Toluidinblau hemmt (MILLER et al. 1952), weil die basischen Farbstoffe und Calcium - bzw. Phosphation um die negativen Ladungen der sauren Mucopolysaccharide konkurrieren.

Die Bedeutung der Grundsubstanz für den Verkalkungsprozess ergibt sich aus den Beobachtungen der pathologischen Verkalkungen, die aufgrund einer alterierenden Grundsubstanz entstehen (NISHIYAMA 1953), wobei es zur Bildung eines Mucopolysaccharid-Ca.-Complexes kommt, wie z.B. Nierensteine (HOWARD et al. 1949; BOYCE und SULKIN 1956 a, b; HOWARD 1951b). Die Störungen der Verkalkungen können entweder an einer fehlerhaften Matrix-Zusammensetzung, oder Abweichungen des Mineralstoffwechsels liegen.

Die Polysaccharide erfahren vor dem Verkalken eine Depolymerisation (BAKER und SISON 1954).

Das Glykogen hat im Verkalkungsprozess zwei Aufgaben:

- 1) In Form des interzellulären Glykogendepots, deren phosphor-lytischer Abbau der lokalen Konzentrationserhöhung des Phosphates sowie dem Aufbau der Grundsubstanz dient.
- 2) Als saure Mucopolysaccharide der Matrix, denen die Rolle eines Mineralakzeptors zukommt.

#### b) Desmale Ossifikation.

Die undifferenzierten Mesenchymzellen osteogenetischer Areale sind glykogenhaltig, aufgrund dessen sie früher zu erkennen sind als durch ihre morphologischen Differenzierungen (GRAU-MANN 1952a, 1953c; SCHAJOWICZ und CABRINI 1954a, b,c; PRETO

PARVIS 1938; HOROWITZ 1942).

Die Umwandlung der Präosteoblasten in Osteoblasten geht mit dem Glykogenschwund einher (HOROWITZ 1942; BEVELANDER und JOHNSON 1950; PRITCHARD 1952; SCHAJOWICZ und CABRINI 1954b,c). Der Glykogenaufbau im Knochengewebe ist für die Wachstumsphase des Knochengewebes bezeichnend, während der Glykogenabbau für die Grundsubstanzbildung charakteristisch ist. Die Osteoidbildung ist durch Perjodatreaktivität und Metachromotropie gekennzeichnet (FOLLIS 1949b; FOLLIS und BERTHRONG 1949; LEVINE et al. 1949; BEVELANDER und JOHNSON 1950, 1951; RUBIN und HOWARD 1950; RIZZOLI 1955a; PRITCHARD 1956 a,b; FREEMAN 1956); die Perjodatreaktivität zeigt eine topographische Beziehung zu Phosphataseaktivität (MOOG und WENGER 1952).

Die Metachromotropie verschwindet mit dem Verkalkungsprozess, während die Perjodatreaktivität erhalten bleibt; außerdem wird das Osteoid mit Alcianblau wegen seines Gehaltes an Mucopolysacchariden blau gefärbt (LISON 1954; RIZZOLLI 1955a; CURRAN und KENNEDY 1955b).

Die Frühphase der Osteoidbildung im Rahmen der desmalen Ossifikation ist auch durch den autoradiographischen nachweisbaren starken Sulfateinbau in die Matrix zu erfassen (FRIBERG und RINGERTZ 1956; VINCENT 1957).

Für die Verkalkungsprozesse der Knochenmatrix sind die gleichen Vorgängen anzunehmen wie bei dem Knorpelgewebe, da enge chemische Beziehungen zwischen der Matrix der beiden Gewebe besteht (GUTMAN und YÜ 1950).

Die Voraussetzungen für die Verkalkung ist auch hier eine Depolymerisation der Grundsubstanz (GERSH und CATCHPOLE 1949; COBB 1949, 1953).

ROCHE(1946); MCLEAN (1959) nehmen an, daß die Verkalkung des Osteoids auch ohne Phosphatase ablaufen kann.

c) Osteoblasten und Osteoklasten.

Osteoblasten enthalten Glykogen (HARRIS 1932a,b; FOLLIS und BERTHRONG 1949; GERARD 1951a; SCHAJOWICZ und CABRINI 1954a,b,c; PETRELLI 1955; FREEMAN 1956), und ein amylase-resistentes, perjodatreaktives Material, wobei es sich wahrscheinlich um ein Glykoproteid handelt (GERSH 1950a; MOOG und WENGER 1952).

Die Ausdifferenzierung der Osteoblasten wird durch das Auftreten von Glykogen und Phosphatase bemerkbar, welches mit der Osteoidbildung abnimmt.

Durch Parathormon wird der Glykogengehalt der Osteoblasten gesenkt (ENGEL et al. 1953) und Glykoproteide verschwinden (GERSH 1950b).

Die Osteoklasten enthalten eine perjodatreaktive Substanz, das wahrscheinlich ein Glykoproteid darstellt (GERSH 1950b; HELLER 1950; HELLER-STEINBERG 1951; HALL 1954). Dieses perjodatreaktive Material wird durch die Osteoklastenfortsätze aus der Grundsubstanz aufgenommen und in deren Cytoplasma verarbeitet und abgebaut (KROON 1954a,b).

Dort, wo die Osteoklasten den Knochen anliegen und auflösen, besteht eine negative perjodatreaktive Stelle, wodurch sich diese Säume histochemisch von den vergleichbaren Oberflächendifferenzierungen des Darmes und der Niere unterscheiden.

d) Enchondrale Ossifikation.

α) Zellen.

Bei der enchondralen Ossifikation ist Glykogen in der Nähe der Verkalkungszone angereichert (ROUGET 1859d; NEUMANN 1877; CREIGHTON 1896). Die Glykogenvermehrung in der Proliferationszone geht mit Zellvergrößerung und Zellreifung einher (SUNDBERG 1924; FOLLIS und BERTHRONG 1949; FREEMAN 1956; SCHAJOWICZ und

CABRINI 1954a)

Mit der Zellvergrößerung ist auch die blasige Umbildung der Knorpelzellen verbunden, aber diese Vergrößerung, die durch Glykogenzunahme bedingt ist, hängt von der Differenzierungsstufe der Zellen ab (HARRIS 1932a,b; GENDRE 1938b).

Das Glykogen kommt sowohl im Cytoplasma (FOLLIS und BERTHRONG 1949), als auch im Zellkern vor (PRETO PARVIS 1938). Mit dem Einsetzen der provisorischen Verkalkung verschwindet das Knorpelglykogen (GIERKE 1907b; SUNDBERG 1924; SEBRUYN 1950; PRITCHARD 1952; SCHAJOWICZ und CABRINI 1954a,c). Es tritt aus degenerierenden Zellen aus und ist dann zwischen den Zellen und Kapillaren histochemisch nachzuweisen und wird schließlich von den Osteoblasten aufgenommen (GENDRE 1938b; SCHAJOWICZ und CABRINI 1954a).

Bei der Ossifikation treten in den Knorpelzellen auch acidophile Körperchen auf, die aus Polysacchariden bestehen; diese Körperchen sind speichelresistent, Perjodatreaktiv, und verhalten sich beim Acetylierungstest positiv (BORGHESE 1953; ZORZOLI 1953a).

### B) Grundsubstanz.

Die histochemischen Veränderungen der Knorpelmatrix bei der enchondralen Ossifikation äußern sich in verstärkter Perjodatreaktivität und Metachromotropie unmittelbar an der Verkalkungszone (RUBIN und HOWARD 1950; SCHAJOWICZ und CABRINI 1954a; FREEMAN 1956).

Die erste Mineralisation erfolgt in den verstärkt metachromotropen Arealen (RUBIN und HOWARD 1950). Diese histochemischen Veränderungen sind auf eine Depolymerisation zurückzuführen, durch die mehr säure-, calciumbindende Gruppen als Voraussetzung für die Mineralisation freigesetzt werden (GERSH und CATCHPOLE 1949; COBB 1949 und 1953). Für diesen Prozess spricht auch eine erhöhte Sensitivität der Matrix für Hyaluronidase (FREEMAN 1956).

Die Perjodatreaktivität fällt zeitlich und örtlich mit der Phosphataseaktivität zusammen. Diese genannten Eigenschaften

der Matrix verschwinden mit der fortschreitenden Verkalkung (LEVINE et al. 1949; FAWNS und LANDELLS 1953), die sich in einem Negativwerden der Hyaluronidasensitivität äußert (FAWNS und LANDELLS 1953), was durch das Verschwinden der Chondroitinschwefelsäure bedingt sein soll. Diese Ansicht ist jedoch nicht haltbar, weil nach der Entkalkung der Matrix mit 1%iger Salpetersäure die Metachromotropie wieder hergestellt wird, da die saure Gruppe der Mucopolysaccharide, die durch Calcium gebunden waren, wieder frei und reaktionsfähig werden. Nach LEVINE et al. (1949); RUBIN und HOWARD (1950); FAWNS und LANDELLS (1953); HOWARD (1951a); SCHAJOWICZ und CABRINI (1954); PRITCHARD (1956a) liegt die Ursache der Metachromotropie in einer Maskierung der sauren Mucopolysaccharide.

Durch autoradiographische Methode hat man die Sulfatveränderungen während der enchondralen Ossifikation bestimmt (DZIEWIATKOWSKI 1952, 1954a; BELANGER 1954b; DAVIES und YOUNG 1954; FRIBERG und RINGERTZ 1954b, 1956; AMPRINO 1955b): Vor dem Einsetzen der enchondralen Ossifikation ist die Sulfataktivität in der epiphysären Knochenmatrix gleichmäßig; bei Beginn der Ossifikation zeigt der Knorpel im Bereich der einsprossenden Gefäße einen Schwund der Basophilie, während die Wandungen dieser Gefäße eine verstärkte Metachromotropie zeigen.

Beim Einsetzen der Chondrocytenhypertrophie wird der Sulfateinbau in der Knorpelmatrix und in der Proliferationszone der Epiphysenscheibe verstärkt, während er in den verknöcherten Zonen abnimmt. Die in den Metaphysen der wachsenden Knochen befindlichen Knorpelstücke sind stark metachromotrop und färben sich mit Mucikarmin und zeigen eine verstärkte BAUER-Reaktivität (WISLOCKI et al. 1947a) und haben einen starken Sulfatumsatz (AMPRINO 1955; DUTHIE und BARKER 1955a).

GODARD (1952a,b 1954a,b) hat nachgewiesen, daß das metaphysäre Knochenwachstum in jeder Phase an das Vorhandensein einer metachromotropen Leitbahn geknüpft ist.

Beim verkalkenden Knorpel bleibt die Perjodatreaktivität

erhalten, was durch ein Freibleiben der Glykosidgruppen zu erklären ist (LEVINE et al. 1949; RUBIN und HOWARD 1950; GERARD 1951b).

2) Reifes Knochengewebe  
a) Osteocyten.

Die Osteocyten enthalten in ihrem Cytoplasma Glykogen (FOLLIS 1949b; FOLLIS und BERTHRONG 1949; GERARD 1951a; HELLER und STEINBERG 1951), das durch das Parathormon beeinflusst wird (ENGEL et al. 1953) und ein Perjodatreaktives Glycoproteid, das speichelresistent ist und einen Indikator für die Aktivität des Knochengewebes darstellt (HELLER 1950; HELLER - STEINBERG 1951). Die Osteocyten enthalten auch noch ein metachromotropes Material (LIPP 1954a), das mit der Eisenbindungsreaktion nachweisbar ist (GEYER 1957), während dieses in den peripheren Zellfortsätzen zum Aufbau der neugebildeten Grundsubstanz im Bereich der ROUGET-NEUMANN'schen Scheiden aufgebraucht wird, kann es im nicht metachromotropen, perinucleären Zellbereich regenerieren.

b) Grundsubstanz.

Die Knochenmatrix enthält 0,3 bis 0,4% Polysaccharide, dessen Konzentration mit fortschreitendem Alter abnimmt (STACK 1955). Diese bestehen aus Glykose, Galaktose, Mannose, Glucosamin, Galaktosamin sowie Glucuronsäure und Sulfatschwefel (ROGERS 1949, 1951; MASAMUNE et al. 1951; EASTOE und EASTOE 1954; GLEGG und EIDINGER 1955) und zwei kohlenhydrathaltige Komponente, die durch eine neue Fraktionierungsmethode (GLEGG und EIDINGER 1955) nachgewiesen wurden. Die Knochenmatrix ist perjodatreaktiv (FOLLIS 1949b; LEBLOND 1950; GERARD 1951b; GRAUMANN 1952a, 1953b; SEO 1953, 1955; LIPP 1954a; SOGNAES 1955) und besitzt eine positive Bleitetraacetat-Leukofuchsin-Reaktion (GRAUMANN 1953a,d). Die Perjodatreaktivität ist besonders während des Umbauprozesses sehr stark (HELLER und STEINBERG 1951) insbesondere an den Wänden der HAVERS'schen Kanäle, während sie in der

interlamellären Substanz sehr schwach ist (ROGERS 1949). Die Perjodatreaktivität der Knochenmatrix der neugebildeten Knochenlamellen ist stärker als in älteren (SEO 1953; VINCENT 1954). Die Perjodatreaktivität ist in den Arealen unmittelbar unter dem Periost und Endost und um die HAVERS'schen Kanäle stärker ausgeprägt als im übrigen Bereich der Kompakta eines Röhrenknochens.

Die Zonen der geringen Mineralisation, die den verstärkten perjodatreaktiven Arealen entsprechen, sind auch die Zonen der geringeren Röntgenabsorption (ENGFELDT und HJERTQUIST 1955).

Die reife Knochenmatrix verhält sich im wesentlichen nicht metachromotrop (SYLVEN 1947b; RUBIN und HOWARD 1950; SIFFERT 1951; PRITCHARD 1952; LIPP 1954a) und ist nur im Bereich der schwachen Röntgenabsorptionsstellen der Matrix zu sehen. Die Metachromotropie tritt jedoch nach Entkalkung des Knochens hervor (LORBER 1951) und wird verstärkt durch Trypsineinwirkung (AMPRINO 1955b).

Durch autoradiographische Methoden kann man den Sulfatumbau auch in der verkalkenden Knochenmatrix nachweisen (ENGFELDT et al. 1954; CURRAN und KENNEDY 1955b; FRIBERG und RINGERTZ 1956; VINCENT 1957), und autoradiographisch kann man auch eine gesteigerte Sulfatbildung während des appositionellen Knochenwachstums feststellen (DUTHIE und BARKER 1955a).

Bei der Entstehung weisen die Osteone eine Metachromotropie auf. Zunächst werden die neutralen Mucopolysaccharide abgeschieden, die dann sekundär verestert werden (VINCENT 1954). Die als ROUGET-NEUMANN'sche Scheiden bekannten unverkalkten perilacunären und pericanaliculären Grundsubstanzschichten verhalten sich ebenfalls metachromotrop (LORBER 1951), die mit der resorptiven Erweiterung der Lacunen verstärkt und durch Testishyaluronidase aufgehoben wird. Das PH-Minimum für Methylenblaubindung an den Grenzscheiden ist 3,0, während bei Knorpelmatrix 2,2 ist. Dieses histochemische Verhalten der

NEUMANN'schen Scheide ist vielleicht auf das Fehlen der Mineralisation und den dadurch bedingten anderen Verhältnissen der Mucopolysaccharide zurückzuführen. Die basophilen Inseln an den Stellen des verstärkten Umbaus, die charakteristisch für das metaphysäre Knochenwachstum sind, verhalten sich perjodatreaktiv, metachromotrop, und sind beeinflussbar durch Hyaluronidase. Der Abbau dieser Insel geht mit einem Schwund der perizellulären, Basophilie der Osteocyten einher.

Für postmortale Veränderungen der Knochenmatrix sind eine Abnahme der Metachromotropie und eine verstärkte Perjodatreaktivität kennzeichnend. Diesen Veränderungen liegt eine Depolymerisation der Mucopolysaccharide zugrunde, die mit einer speziellen Jodsäuresilbermethode erfassbar ist (DETMER et al. 1956).

#### c) Periost.

Im wachsenden Knochen verhalten sich die Bindegewebszellen des Periost perjodatreaktiv und sind zum Teil auch glykogenhaltig (BEVELANDER und JOHNSON 1946, 1951; MOOG und WENGER 1952), während sie in den Periostzellen des ausgewachsenen Knochens fehlt (PRITCHARD 1952).

Das Periost des fetalen Knochens ist metachromotrop (HOLMGREN 1940; FRIBERG und RINGERTZ 1956), jedoch nicht bei ausgewachsenen Skelettstücken (SYLVEN 1947b). Das Periost besitzt einen Sulfatumsatz, der autoradiographisch sowie im adulten, als auch im fetalen Periost nachzuweisen ist (ENGFELDT et al. 1954; AMPRINO 1955a; DUTHIE und BARKER 1955a; FRIBERG und RINGERTZ 1956).

V. Histochemisches Verhalten des Knochens bei pathologischen Veränderungen und unter experimentellen Bedingungen.

Der Frakturkallus enthält metachromotropes Material, das hyaluronidaseresistent ist und mit der weiteren Differenzierung des Kallus verschwindet. Die Metachromotropie hat ihr Maximum am 10. Tag erreicht und verschwindet am 14. Tag (RAGAN 1950a). Wegen der zu geringeren Konzentration ist das metachromotrope Material auf chemischen Wegen nicht zu isolieren (HUDACK et al. 1949; SIFFERT 1951). Die Mucopolysaccharide des Frakturkallus besitzen einen raschen Umsatz, der autoradiographisch zu bestimmen ist (DUTHIE und BARKER 1955a). Durch Cortisoneinwirkung kommt es zur Verzögerung der Kallusbildung und zu Störungen der enchondralen Ossifikation, während die desmale Ossifikation nicht gestört wird (BLUNT et al. 1950; DUTHIE und BARKER 1955b).

Beim Skorbut liegt eine Dissoziation der chondroblastischen und osteoblastischen Aktivität vor; nur die Osteoblasten werden durch Vitamin-C-Mangel beeinträchtigt und es kommt zu Störungen der Osteoidbildung (FOLLIS 1951). Den Osteoblasten in der Trümmerfeldzone fehlt das Glykogen; und R.N.S. ist beträchtlich vermindert. Deshalb verhält sich das Skorbutosteoid schwach metachromotrop und perjodatreaktiv, was auch autoradiographisch nachzuweisen ist (REDDI und NORSTRÖM 1954; BOURNE 1956; CRUCHAUD 1956).

Die Osteocyten enthalten bei rachitischen Knochen sehr wenig Glykogen bzw. Glykoproteide (HELLER und STEINBERG 1951). Das rachitische Osteoid ist stark perjodatreaktiv (COBB 1953) und metachromotrop (FOLLIS 1949b). Während der enchondralen Ossifikation ist das Glykogen nur bis in die ersten Schichten des hypertrophen Knorpels nachzuweisen, während der darauf folgende Bereich glykogenfrei ist. In dieser Zone kommt es auch nicht zur Mineralisation wegen des Fehlens

des Glykogens bzw. der Bildung von Hexosephosphat.

Das Glykogen kommt auch in den Zellen der osteoblastischen Tumoren und Osteosarkomen (KRUCKENBERG 1954; LANGHANS 1890) vor. Bei den Osteosarkomen ist Glykogen in den Chondroblasten reichlich vorhanden, während es in den verkalkenden Zonen fehlt (SCHAJOWICZ und CABRINI 1954a).

Durch Parathormoneinwirkung kommt es zu Depolymerisation der Knochen- und Knorpelgrundsubstanz, die besonders aber auch am perichondralen und periostalen Gewebe eingreifen (ENGEL 1952a). Es kommt zur Freisetzung der Mineralstoffe und Erhöhung des Mucoproteidspiegels im Serum. Die Perjodatreaktivität der Matrix wird verstärkt; die wasserlöslichen, alkohollöslichen Mucopolysaccharide sind vermehrt (GERSH 1950b; ENGEL et al. 1953; GAILLARD 1953a,b).

Cortisoneinwirkung führt zur Verhinderung der Ausreifung der hypertrophen Chondrocyten im Bereich der Epiphysenepiphysealscheibe.

Bei  $D_3$  Hypervitaminose kommt es zu einer verstärkten Kalk-einlagerung in den bereits vorhandenen Knochenbälkchen und eine durch Depolymerisation bedingte, verstärkte Perjodatreaktivität. Das neu und vermehrt gebildete Osteoid ist wegen seines hohen Polymerisationsgrades schwach perjodatreaktiv und deshalb nicht für eine Mineralisation geeignet. Durch Strahleneinwirkungen kommt es zu abnormen reparativen Prozessen am wachsenden Knochen. Es kommt zum Auftreten von perjodatreaktiven Granula, besonders im Bereich der Osteoklasten und alterierenden Reticulumzellen des Markes; sie enthalten Glykogen und Glykoproteide. Diese Granula sind resistent gegen Trypsin, Kollagenase und Hyaluronidase. Das unter Strahleneinwirkung gebildete verkalkungsfähige Osteoid ist stark perjodatreaktiv und besitzt einen abnorm niedrigen Polymerisationsgrad (BURSTONE 1952).

### Literatur

- AKAMINE, R.N.C., ENGEL, M.B. and SARNAT, B.G. (1954): Histochemical studies of cartilage implants.- J. Bone Jt. Surg. 36, 1166-1174.
- AMPRINO, R. (1955): Autoradiographic research on the  $S^{35}$  sulphate metabolism in cartilage and bone differentiation and growth.- Acta anat. 24, 121-163.
- ARNDT, H. J. (1928): Vergleichend morphologische und experimentelle Untersuchungen über den Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsel der Gewebe.- Beitr. path. Anat. 79, 69, 116, 523-588.
- EACSICH, P. and RIDDELL, W. J. B. (1945): Structure and nutrition of the cornea, cartilage, and Wharton's jelly.- Nature (lond.) 155, 271.
- BAKER, R. and SISON, F. (1954): Demonstration of altered tissue mucopolysaccharides in renal calculus disease by selective staining techniques.- J. Urol. (Baltimore) 72, 1032-1045.
- BARCROFT, J. DANIELLE, J. F., HARPER, W. F. and MITCHELL, P. D. (1944): Wharton's jelly considered as a conducting path.- Nature (lond.) 154, 667.
- BELANGER, L.F. (1954b): Autoradiographic visualization of the entry and transit of  $S^{35}$  in cartilage, bone, and dentine of young rats and the effect in hyaluronidase in vitro.- Canad. J. Biochem. 32, 161-169.
- BEVELANDER, G. and JOHNSON, P.L. (1946): The histochemical localization of glycogen in the developing tooth.- J. cell. comp. Physiol. 28, 129-137.
- (1950): A histochemical study of the development of membrane bone.- Anat. Rec. 108, 1-22.
- (1951): Some histochemical observations on the development of membrane bone.- Trans. Conf. Metab. Interrel. (Jos. Macy Found. Edith.: REIFENSTEIN, E. C.) 3, 25-37.
- BIGNARDI, C. (1939d): Ricerche preliminari sulla istochimica del tessuto cartilagineo. Atti Soc. nat. mat. (Modena) 70, 97-102.

- BLIX, G. (1940): Studies in glycoproteins.- Acta physiol. scand. 1, 29-42.
- BLUNT Jr., J.W., PLOTZ, C.M., LATTES, R., HOWES, E.L. MEYER, K. and RAGAN, Ch. (1950): Effect of cortisone on experimental fractures in the rabbit.- Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 73, 678-681.
- BORGHESE, E. (1953): Indagine istochemiche sulla "sferula acidofila" delle cellule cartilaginee ipertrofiche.- Boll. Soc. ital. Biol. sper. 29, 292-293.
- BOSTRÖM, H. and ODEBLAD, E. (1952): Autoradiographic observations on the uptake of  $S^{35}$  in the genital organs of the female rat and rabbit after injection of labelled sulfate.- Acta endocr. (Kgh.) 10, 89-96.
- (1954b): The influence of cortisone upon the sulfate exchange of chondroitin sulphuric acid.- Ark. Kemi 6, 39-42.
- BOURNE, G.H. (1956): Vitamin C and bone.- In: BOURNE, G. H. The Biochemistry and Physiology of Bone. Academic Press, New York.
- BOYCE, W.H. and SULKIN, N.M. (1956a): Biocolloids of urine in health and in calculous disease. III. The mucoprotein matrix of urinary calculi.- J. clin. Invest. 35, 1067-1079.
- (1956b): The mucopolysaccharide-mucoprotein matrix of urinary calculi, biochemical analysis and histochemical studies.- Proc. South. Soc. clin. Res.
- BURSTONE, M. S. (1952): A histochemical study of irradiated bone.- Amer. J. Path. 28, 1133-1141.
- CANEPA, G. (1956a): Istologia ed istochimica delle cartilagini costale in rapporto al problema dell'identificazione dell'età.- Med. leg. 4, 167-205.
- (1956b): Reperti istologici ed istochimici nelle cartilagini costale e resistenza al fenomeno.- Pathologica 46, 5-11.
- CAMPBELL, D. and PERSON, B.H. (1951): Use of track autoradiography in studies on the sulphur metabolism of connective tissue.- Experientia 7, 304-306.
- CAMURATI, C. e TESSAROLO, G. (1953): Influenze del carico e della avitaminosi e sulla cartilagine di accrescimento delle caviglie (Ricerche istochimiche).- Minerva ostop. 4, 131-134.

- CASTIGLIONI, G.G. (1949/50): L'enzima mucinolitico in istologia.- Biol. latin. (Milano) 2, 585-591.
- COBB, J. (1949): The morphological distribution of glycogen and glycoprotein in cells and extracellular material of growing bones.- Thesis, Univ. of Illinois.
- (1953): Relation of glycogen, phosphorylase, and ground substance to calcification of bone.- A.M.A. Arch. Path. 55, 496-502.
- COUTEAUX-BARGETON, M. (1950): Mode de repartition de glycogene dans le cytoplasme de divers types cellulaires.- C.R. Soc. Biol. (Paris) 144, 880-882.
- CURRAN, R.C. and GIBSON, T. (1956): The uptake of labelled sulphate by human cartilage cells and its use as a test for viability.- Proc. roy. Soc. B. 144, 572-576.
- CURRAN, R.C. and KENNEDY, J.S. (1955a): Utilization of sulphate ion by fibroblasts in the quartz focus.- Nature (Lond). 175, 435-436.
- (1955b): The distribution of the sulphated mucopolysaccharides in the mouse.- J. Path. Bact. 70, 449-457.
- DAVIES, D.V. and YOUNG, L. (1954): The distribution of radioactive sulphur ( $S^{35}$ ) in the fibrous tissues, cartilages and bones of the rat following its administration in the form of inorganic sulphate.- J. Anat. (Lond). 88, 174-183.
- DEMPSEY, E. W., BUNTING, H., SINGER, M. and WISLOCKI, G. B. (1947a): The dye-binding capacity and other chemo-histological properties of mammalian mucopolysaccharides.- Anat. Rec. 98, 417-429.
- DETMER, N., SCHMITT-ROHDE, J.M. and HABERTICH, F.J. (1956): Über histologisch und mikrodensometrisch nachweisbare post-mortale Veränderungen der Knochengrundsubstanz.- Virchows Arch. path. Anat. 328, 324-336.
- DUTHIE, R.B. and BARKER, A.N. (1955a): An autoradiographic study of mucopolysaccharide and phosphate complexes in bone growth and repair.- J. Bone Jt Surg. 37b, 304-323.

- (1955b): The histochemistry of the preosseous stage of bone repair studied by autoradiography.- The effect of cortisone.- J. Bone Jt Surg. 37, 691-710.
- DZIEWIATKOWSKI, D.D. (1952): Radioautographic studies of sulfate-sulfur ( $S^{35}$ ) metabolism in the articular cartilage and bone of suckling rats.- J. exp. Med. 95, 489-496.
- (1954a): Effect of age on some aspects of sulfate metabolism in the rat.- J. exp. Med. 99, 283-298.
- EASTOE, J.E. (1956): The organic matrix of bone.- In: BOURNE, G. H., the biochemistry and physiology of bone, pp. 81-105.- Academic Press, New York.
- EASTOE, J.E. and EASTOE, B. (1954): The organic constituents of mammalian compact bone.- J. Biochem. 57, 453-459.
- EHRLICH, P. (1883): Über das Vorkommen von Glykogen im diabetischen und im normalen Organismus.- Z. klin. Med. 6, 33-46.
- (1877): Beiträge zur Kenntnis der Anilinfärbungen und ihrer Verwendung in der mikroskopischen Technik.- Arch. mikr. Anat. 13, 263, 277.
- ENGEL, M. B. (1952a): Mobilization of mucoprotein by parathyroid extract.- A.M.A. Arch. Path. 53, 339-351.
- ENGEL, M.B. CATCHPOLE, H.R. and JOSEPH, N.R. (1953): The effect of parathyroid extract on ground substance and calcium of bone.- Trans. Conf. metab. Interrel. (Jos. Macy Found. Edit.: E.C. Reifstein) 5, 119-129.
- ENGELFELDT, B., ENGSTRÖM, A. and BOSTRÖM, H. (1954): The localization of radiosulfate in bone tissue.- Exp. Cell. Res. 6, 251-253.
- FAWNS, H.T. and LANDESSL, J.W. (1953): Histochemical studies of rheumatic conditions. I. Observations on the fine structures of the matrix of normal bone and cartilage.- Ann. rheum. Dis. 12, 105-113.
- FELL, H.B. and MELLANBY, E. (1952): The effect of hypervitaminosis A on embryonic limb-bones cultivated in vitro.- J. Physiol. (Lond.) 116, 320-349.

FISCHER-WASELS, J. (1952): Histochemische und histophysikalische Untersuchungen am Knorpel bei Arthrosis deformans.- Verh. Dtsch. orthop. Ges. (Beilageh.) Z. Orthop. 83, 276-279.

FOLLIS jr., R.H. (1949b): Some histochemical observations on normal and diseased cartilage and bone.- Trans. Conf. metabol. Interrel. (Jos. Macy Found, Edit.: Reifstein, E.C.) 1, 27-32.

- (1951a): Effect of proteolytic enzymes and fixation on metachromasia of skin collagen.- Proc. Soc. exp. Biol.(N.Y.) 76, 272-273.

-(1952b): Osteogenesis imperfecta congenita. A connective tissue diathesis.- J. Ped. 41, 713-721.

-(1953): Histochemical studies on cartilage and bone. III. Osteogenesis imperfecta.- Bull. Johns Hopk. Hosp. 93, 386-398.

FOLLIS jr., R.H. and BERTHRONG, M. (1948): Studies on cartilage and bone.- Amer. J. Path. 24, 685.

-(1949): Histochemical studies on cartilage and bone. I. The normal pattern.- Bull. Johns Hopk. Hosp. 85, 281-297.

FORAKER, A. G. y MARINO, G. (1956b): Estudios bioquímicos en el condrosarcoma.- Folia clin. int. (Barcelona) 6, No.2.

FREEMAN, D. J. (1956): Some observations on calcifying cartilage matrix.- A.M.A. Arch. Path. 61, 219-225.

FRIBERG, U. and Ringertz, N.R. (1954b): Autoradiographic studies with  $S^{35}$  on the development of the rat embryo.- Experientia. 10, 67.

-(1956): An autoradiographic study on the uptake of radio - sulphate in the rat embryo.- J. Embryol. exp. Morph. 4, 313-325.

GERSH, I. (1950a): Glycoproteins in the thyroid gland of rats.- J. Endocr. 6, 282-287.

-(1950b): Ground substance and the plasticity of connective tissues.- Harvey Lect. Ser 45, 211-241.

GERSH, I and CATCHPOLE, H. R. (1949): The organization of ground substance and basement membrane and its significance

in tissue injury, disease and growth.- Amer.J. Anat.85, 457-521.

GENDRE, H. (1938b): Le glycogène dans les cartilages en voie d'ossification.-Bull. Histol. Techn. micr. 15,165-178.

GERARD, G. (1951a): Estudio histoquímico de la osificación en el hombre. I Mucopolisacáridos y calcificación en la osificación directa.-Arch. Soc. Biol. (Montevideo) 18,74-80.

-(1951b): Estudio histoquímico de la osificación en el hombre. II. Mucopolisacáridos en la osificación endocondral.- Arch. Soc. Biol. (Montevideo) 18,103-109.

GEYER, G. (1957): Vergleichende topochemische Untersuchungen mit der Reaktion nach Hale und ihrer Modifikation von G.Müller an einigen Organen und Geweben der weißen Ratte.-Acta histochem. (Jena) 5, 62-78.

GIBSON, T, CURRAN, R.C. and KENNEDY, J.S. (1955): The uptake of labeled sulphate ( $S^{35}$ ) in vitro by chondrocytes.-Transplant. Bull. 2,44.

GIERKE, E. (1905): Das Glykogen in der Morphologie des Zellstoffwechsels.-Beitr. path. Anat. 37,502-567.

-(1907a): Zum Stoffwechsel des Fettgewebes.

GLEGG, R.E., CLERMONT, Y and LEBLOND, C.P. (1952): The use of lead tetraacetate, benzidine, o-dianisidine and a "film-test" in investigating the periodic acid-Schiff technic.-Stain Technol. 27,277-305.

GLEGG, R.E., EIDINGER, D. and LEBLOND, C.P. (1953): Some carbohydrate components of reticular fibers.-Science 118, 614-616.

-(1955): A method for fractionating the carbohydrate components of bone.- Arch. Biochem. 55,19-24.

GLOCK, G.E. (1940): Glycogen and Calcification.-J. Physiol. 98, 1-11.

GODARD, H. (1952b): La croissance osseuse et les mucopolysaccharides.- Presse med. 60, 1799-1802.

-(1952a): L'ostéogenèse de croissance épiphysaire et les

mucopolysacharides de l'os.- Presse med. 60, 414-416.

-(1954a): Le tissu osseux de croissance metaphysaire (Texture heterogene. Centres metachromatiques).- C.R. Ass. Anat. 41, 1-7.

-(1954b): Modes de croissance des os diaphysaires.-C.R. Ass. Anat. 41, 1-11.

GRAUMANN, W. (1952a): Das Vorkommen von Perjodshure-Leukofuchsin (PSL)-positiven Substanzen im embryonalen Organismus. Anat. Anz. 99, 19-20.

- (1952b): Die Histotopik von Polysaccharidverbindungen während der Eimplantation.- Verh. anat. Ges. 50, 227-233.

-(1953a): Zur Standardisierung des Schiffschens Reagens.-Z. wiss. Mikr. 61, 225-226.

-(1953b): Die histochemische Reaktion der Knorpelgrundsubstanz mit Perjodshure und Bleitetraacetat.- Mikroskopie 8, 218-225.

-(1953c): Glykogen im embryonalen Kopfbindegewebe.-Verh. anat. Ges. 51, 219-227.

-(1953d): Erfahrungen mit Bleitetraacetat als Oxydans für 1,2-Glykole.- Z. Wiss. Mikr. 61, 361-364.

GUIZETTI, P. (1910): Das Glykogen im menschlichen Knorpelgewebe.- Zbl. allg. Path. path. Anat. 21, 481-489.

GUTMANN, A.B. (1950): Diskussionsbemerkung.- Trans. Conf. metabol. Interrel. (Jos. Macy Found., edit.: REIFENSTEIN, E.C.) 2, 255-257.

GUTMAN, A.B. and GUTMAN, E.B. (1941): A phosphorylase in calcifying cartilage.-Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 48, 687-691.

GUTMAN, A.B. and YÜ, F.F. (1949): further studies of the relation between glycogenolysis and calcification in cartilage.- Trans. Conf. metabol. Interrel. (Jos. Macy Found., edit.: REIFENSTEIN, E.C.) 1, 11-26.

-(1950): A concept of the role of enzymes in endochondral calcification.-Trans. Conf. Metabol. Interrel. (Jos. Macy Found., edit.: REIFENSTEIN, E.C.) 2, 167-190.

- HALL, K. (1934): Changes in the bone and cartilage of the symphysis pubis of the mouse during pregnancy and after parturition, as revealed by metachromatic staining and periodic acid-Schiff technique.- J. Endocr. 11, 210-222.
- HARRIS, H.A. (1932a): Glycogen in cartilage.- Nature (Lond.) 130, 996-997.
- HASS, G.M. (1943): Studies of cartilage. IV. A. morphologic and chemical analysis of aging human costal cartilage.- Arch. Path. 35, 275-284.
- HELLER, M. (1950): Occurrence of possibly secretory granules in osteogenic cells.- Anat. Rec. 106-204.
- HOFFMANN, A., LEHMANN, G. und WERTHEIMER, E. (1928): Der Glykogenbestand des Knorpels und seine Bedeutung - Pflügers Arch. ges. Physiol. 220, 183-193.
- HAYASHI, H., FUNAKI, T. UDAKA, K. and KATO, Y. (1955a): Studies on acid mucopolysaccharides of the ground substance of connective tissue. Report I.- Mie med. J. 4 (Suppl.) 2, 143-158.
- HAYASHI, H., UDAKA, K., FUNAKI, P. and INONE, T. (1955b): Studies on acid mucopolysaccharides of the ground substance of connective tissue. Report II.- Mie med. J. 4 (Suppl.2), 159-167.
- HOLMGREN, HJ. (1939): Über Vorkommen und Bedeutung der chromotropen (metachromatischen) Substanz in menschlichen Feten.- Anat. Anz. 88, 246-251.
- (1940): Studien über Verbreitung und Bedeutung der chromotropen Substanz.- Z. mikr.- anat. Forsch. 47, 489-521.
- HOROWITZ, N.H. (1942): Histochemical study of phosphatase and glycogen in fetal heads.- J. dent. Res. 21, 519-527.
- HOWARD, J. E., (1951a): Metabolism of calcium and phosphorus in bone.- Bull. N.Y. Acad. Med. 27, 24-41.
- (1951b): Some current concept on the mechanism of calcification.- J. Bone J. Surg. 33, 801-806.
- HOWARD, J.E., CAREY, R.A., RUBIN, P.S. and LEVINE, M.D. (1949): Diagnostic problems in patients with hypercalcemia.-

Trans. Ass. Amer. Phycns 62, 264-269.

HUDACK, S.S., BLUNT jr., J.W., HIGBEE, P. and KEARIN, G.M. (1949): A probable acid mucopolysaccharide present in granulation tissue.- Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 72, 526-528.  
HUDACK, S.S. and BLUNT, J.W. (1950): Basic processes in healing.- Amer. J. Surg. 80, 680-684.

JÄRVI, O. und TEIR, H. (1947): Über die Färbung von Glykogen, Schleim, Knorpel, Amyloid und Hyalin mit der Reaktion von Bauer.- Acta. Soc. Med. „Duodecim.“ 23, 7-24.

JOEL, W., MASTERS, Y.F. and SHETLAR, M.R. (1956): Comparison of histochemical and biochemical methods for the polysaccharides of cartilage.- J. Histochem. Cytochem. 4, 476-478.

KROON, D.B. (1954a): The bone destroying function of the osteoclasts (Koelliker's "brush border").- Acta anat. (Basel) 21, 1-18.

- (1954b): "Bortelzomen" van osteoclasten bij actieve beenafbraak.- Ned. T. Geneesk. 98, 815-816.

LANGHANS, Th. (1890): Über Glykogen in pathologischen Neubildungen und in menschlichen Eihäuten.- Virchows Arch. path. Anat. 120, 28-67.

LAVES, W. (1948a): Histologische Untersuchungen über die Wirkung der Hyaluronidase auf Knorpel.- Klin. Wschr. 26, 534-536.

LEBLOND, C.P. (1950): Distribution of periodic acid-reactive carbohydrates in the adult rat.- Amer. J. Anat. 86, 1-49.

LEVINE, M.D., RUBIN, P.S., FOLLIES, R.H. and HOWARD, J.E. (1949): Histochemical studies on calcinosis universalis with respect to the possible relationship between normal and pathological calcification.- Trans. Conf. Metab. Interrel. (Jos. Macy Found., Edit.: REIFENSTEIN, E. C.) 1, 41-48.

LILLIE, R.D. (1949b): On the destructions of cytoplasmic basophilia (ribonucleic acid) and of the metachromatic basophilia of cartilage by the glycogen splitting enzyme malt diastase: a histochemically study.- Anat. Rec. 103, 611-633.

- LISON, L. (1954): Alcian blue 8G with chlorantine fast red 5B. A technique for selective staining of mucopolysaccharides.- *Stain Technol.* 29, 131-138.
- LIPP, W. (1954a): Neuuntersuchungen des Knochengewebes.- *Acta anat. (Basel)* 20, 162-200.
- (1954b): Neuuntersuchungen des Knochengewebes. II. Histologisch erfassbare Lebensäußerungen der Knochenzellen.- *Acta anat. (Basel)* 22, 151-201.
- LÖBEL, S.F. (1956): Estudios histoquímicos sobre polisacáridos.- IV. Metacromasia secundaria.- *Biologica (Santiago)* 22, 73-77.
- LOEWI, G. (1953): Changes in the ground substance of ageing cartilage.- *J. Path. Bact.* 65, 381-388.
- MASAMUNE, H., YOSIZAWA, Z. and MAKI, M. (1951): zitiert nach EASTOE 1956.
- MCMANUS, J.F.A. (1954): Histochemistry of connective tissue.- In: ASBOE-HANSEN, G., *Connective tissue in health and disease*, pp. 31-53.- Munksgaard, Copenhagen.
- MEYER, A. (1944): Das Vorkommen der Chondroitinschwefelsäure im skorbutischen Knorpel.- *Z. Vitaminforsch.* 14, 332-339.
- MEYER, K. (1950c): Chemistry of connective tissue, polysaccharides.- *Trans. Conf. Connect. Tiss. (Jos. Macy Found., Edit.: RAGAN, CH.)* 1, 88-100.
- (1952c): The polysaccharides of mesodermal tissues.- *Trans. Conf. Metabol. Interrel. (Jos. Macy Found., Edit.: REIFENSTEIN, E.C.)* 4, 63-73.
- (1954): The chemistry of the ground substance of connective tissue.- In: ASBOE-HANSEN, G., *Connective tissue in health and disease*.- Munksgaard, Copenhagen.
- MILLER, Z.B., WALDMAN, J. and MCLEAN, F.C. (1952): The effect of dyes on the calcification of hypertrophic rachitic cartilage in vitro.- *J. exp. Med.* 95, 497-508.
- MONTAGNA, W. (1949): Glycogen and lipids in human cartilage, with some cytochemical observation on the cartilage of the dog.

- cat and rabbit.- Anat. Rec. 103,77-92.
- MOOG, F. and WENGER, E.L. (1952): The occurrence of a neutral mucopolysaccharide at sites of high alkaline phosphatase activity.- Amer. J. Anat. 90, 339-378.
- MOSCONA, A. and MOSCONA, H. (1952a): The dissociation and aggregation of cells from organ rudiments of the early chick embryo.- J. Anat. 86, 287-301.
- NEUMAN, W. F., Boyd, E.S. and FELDMAN, S. (1952): The ion-binding properties of cartilage.- Trans. Conf. Metabol. Interrel. (Jos. Macy Found. Edit.: REIFENSTEIN, E.C.) 4, 100-122.
- NEUMANN, E. (1877): Die Jodreaktion der Knorpel- und Chordazellen.- Arch. mikr. Anat. 14, 54-59.
- (1880): Die Picrocarminfärbung und ihre Anwendung auf die Entzündungslehre.- Arch. mikr. Anat. 18, 130-150.
- NISHIYAMA, Y. (1953): Histochemical studies on pathologic calcification.- Keio J. Med. 2, 59-71.
- PARTRIDGE, S. M. (1948): The chemistry of connective tissues. 1. The state of combination of chondroitin sulphate in cartilage.- Biochem. J. 43, 387-397.
- PELC, S. R. and GLÜCKSMANN, A. (1955): Sulphate metabolism in the cartilage of the trachea, pinna and xiphoid process of the adult mouse as indicated by autoradiographs.- Exp. Cell. Res. 8, 336-344.
- PETRELLI, E. (1955): Appunti sulla distribuzione del glicogeno e della fosfomonoesterasi alcalina durante il processo di ossificazione in un segmento scheletrico cartilagineo.- Biol. lat. (Milano) 8, 145-162.
- PISCHINGER, A. (1926): Die Lage des isoelektrischen Punktes histologischer Elemente als Ursache ihrer verschiedenen Färbbarkeit.- Z. Zellforsch. 3, 169-197.
- PRETO PARVIS, V., e RONCORONI, G. (1951): Contributo morfologico e istochimico allo studio della condrogenesi.- Atti Soc. ital. Anat. 13, 1-4.
- PRETO PARVIS, V. (1938): Glicogeno e ossificazione in embrioni di ratto.- Arch. Ist. biochim. ital. 3, 1-10.

- (1941): Glicogeno embrionale e moltiplicazione cellulare.- Arch. ital. Anat. Embriol. 45, 312-358.
- PRITCHARD, J.J. (1949): A new histochemical method for glycogen.- J. Anat. (Lond.) 83, 30-31.
- (1952): A cytological and histochemical study of bone and cartilage formation in the rat.- J. Anat. (Lond.) 86, 259-277.
- (1956a): General anatomy and histology of bone.- In: BOURNE, G.H., The Biochemistry and Physiology of Bone, pp. 1-25.- Academic Press, New York.
- (1956b): The osteoblast.- In: BOURNE, G. H., The Biochemistry and Physiology of Bone.- Academic Press New York.
- RABE, F. (1919): Experimentelle Untersuchungen über den Gehalt des Knorpels an Glykogen und Fett.- Beitr. path. Anat. 48, 554-575.
- REDDI, K.K. and NÖRSTROM, A. (1954): Influence of vitamin C on the utilization of sulphate labelled with sulphur-35 in the synthesis of chondroitin sulphate of the costal cartilage of the guinea-pig.- Nature (Lond.) 173, 1232-1233.
- RIZZOLI, C. (1953): Ricerche istochimiche sull'organizzazione dei tessuti connettivi.- Monit. zool. ital. 61, 90-98.
- (1955a): Le basi istochimiche della colorazione dei mucopolisaccaridi nei tessuti con il blu alcian 8 GN.- Boll. Soc. ital. Biol. sper. 31, 422-425.
- (1955b): Ricerche sulla natura e distribuzione dei mucopolisaccaridi nei tessuti animali.- Riv. Istochim. 1, 345-382.
- RIZZOLI, C. e MASTROBUONO, M. (1953): Osservazioni istochimiche sulla cartilagine ialina.- Boll. Soc. ital. Biol. sper. 29, 1418-1421.
- (1955): Ricerche sulle caratteristiche istochimiche della cartilagine ialina umana nelle diverse età.- Boll. Soc. ital. Biol. sper. 31, 223-226.
- ROBERTSON, W. V. B., ROPES, M.W. and BAUER, W. (1941): The degradation of mucins and polysaccharides by ascorbic acid and hydrogen peroxide.- Biochem. J. 35, 903-908.

- ROBISON, R. (1923): The possible significance of hexose-phosphoric esters in ossification.- *Biochem. J.* 17, 286-293.
- ROBISON, R. and ROSENHEIM, A.H. (1934): Calcification of hypertrophic cartilage in vitro.-*Biochem. J.* 28, 684-698.
- ROCHE, J. (1946): La phosphatase des os et le mecanisme general de l'ossification.- *Experientia (Basel)* 2, 325-336.
- ROGERS, H.J. (1949): Concentration and distribution of polysaccharides in human cortical bone and the dentine of teeth.- *Nature (Lond.)* 164, 625-626.
- (1951): The polysaccharide associated with the organic matrix of bone.- *Biochem. J.* 49, 12-13.
- ROUGET, Ch. (1859a): Des substances amyloides, de leur role dans la constitution des tissus des animaux.-*J. Physiol. (Paris)* 2, 88-93.
- (1859b): Des substances amylacees dans les issus des animaux, specialement des articules (chitine).- *C.R.Acad. Sci. (Paris)* 48, 792-795.
- RUBIN, P.S. and HOWARD, J.E. (1950): Histochemical studies on the role of acid mucopolysaccharides in calcifiability and calcification.- *Trans. Conf. Metabol. Int. Jos. Macy Found., Edit. REIFENSTEIN, E.C.* 2, 155-166.
- SCHAJOWICZ, F. and CABRINI, R.L. (1954a): Histochemical studies of bone in normal and pathological conditions. With special reference to alkaline phosphatase, glycogen and mucopolysaccharides.-*J. Bone Jt. Surg.* 36B, 474-489.
- (1954b): Osificacion normal y patologica. Estudio histologico e histoquimico de la osificacion directa (membranosa).- *Rev. Asoc. med. argent.* 68, 559-565.
- (1954c): Problemas histoquimicos relacionados con la calcification, osificacion y dentinogenesis (pagpel de la fosfatasa alcaline, el glucogeno y el acido ribonucleico citoplasmatico).-*Rev. odont. (Buenos Aires)* 42, 467-473.
- (1955): The effect of acids (decalcifying solutions) and enzymes on the histochemical behaviour of bone and cartilage.- *J. Histochem. Cytochem.* 3, 122-129.

SEO, S. (1953): Occurrence of periodic acid Schiff's reaction in various tissues of the adult rat.-Kyushu Mem. med. Sci. 4, 131-142.

-(1955): Changes in the reaction of tissues to periodic acid Schiff's stain during the development of white rat.- Kyushu Mem. med. Sci. 5, 169-182.

SEBRUYS, M. (1950): De Histotopochemie van het Glycogeen en de alcalische Phosphatase in het embryonnaire en jonge Kraakbeen.- Naturw. Tijdschr. 32, 110-114.

SIFFERT, R.S. (1951): The role of alkaline phosphatase in osteogenesis.- J. exp. Med. 93, 415-426.

STARCK, M.V.(1955): The chemical nature of the organic matrix of bone, dentin , and enamel.- Ann. N. Y. Acad. sci. 60, 585-595.

SOGNNAES, R.F. (1955): Microstructure and histochemical characteristics of the mineralized tissues. -Ann. N.Y. Acad. Sci. 60, 545-574.

SUNDBERG, C. (1924): Das Glykogen in menschlichen Embryonen von 15, 17 und 40 mm.- Z. Anat. Entwickl. gesch. 73, 168-246.

SYLVEN, B. (1938b): Experimentelle Beiträge zur Kenntnis der Färbung mit Mucicarmin nach P. Mayer.-Z. wiss. Mikr. 55, 462-469.

SYLVEN, B. (1947a): Cartilage and chondroitin sulfate. I The physiological role of chondroitin sulfate in cartilage.- J. Bone Jt. Surg. 29, 745-752.

-(1947b): Cartilage and chondroitin sulfate. II. Chondroitin sulfate and the physiological ossification of cartilage.- J. Bone Jt. Surg. 29, 973-976.

-(1947c): Changes in cartilage produced by infiltrating carcinoma. Brit. J. Chancer 1, 103-109.

-(1948a): Cartilage and chondroitin sulphate. III. Chondroitin sulphate and inflammatory lesions of cartilage.- J. Bone Jt. Surg. 30, 158-162.

-(1948b): Biological aspects of the physiology of hyaline cartilage.- Acta orthop. scand. 18, 21-27.

- SYLVEN, B. (1949): Ester sulphuric acids in stroma connective tissue.- Acta radiol. (Stockh.) 31, 11-16.
- VINCENT, J. (1954): Recherches sur la constitution du tissu osseux compact.- Arch. Biol. (Liege) 65, 531-569.
- (1957): Le remaniement de l'os compact chez le cercopitheque.- Arch. Biol. (Liege) 68, 561-579.
- WALLRAFF, J. und BECKERT, H. (1939): Zur Frage der Spezifität des mikroskopisch chemischen Nachweises von Glykogen und anderen Polysacchariden nach H. BAUER.- Z. mikr.-anat.Forsch. 45, 510-530.
- WINTER, W. (1932): Beiträge zur Kenntnis der quantitativen Zusammensetzung des Knorpelgewebes.- Biochem. Z. 246, 10-28.
- WISLOCKI, G. B., BUNTING, H. and DEMPSEY, E.W. (1947a): Metachromasia in mammalian tissues and its relationship to mucopolysaccharides.- Amer. J. Anat. 81, 1-37.
- WOLMAN, M. (1956a): Histological changes produced by injections of polysaccharides.- Arch. Path. 62, 149-154.
- (1956b): A histochemical method for the differential staining of acidic tissue components (particularly ground substance polysaccharides). -Bull. Res. Council. Israel 6 E. 27-35.

N a c h s a t z !

An dieser Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. med. W a t z k a -  
für die Überlassung des Themas und seine Zuvorkommenheit danken.



## Lebenslauf

Am 28.12.1938 bin ich in Meched/Iran geboren.

Die Volksschule besuchte ich in Meched/Iran  
und habe die Reifeprüfung (Abitur) 1957 in der  
Oberrealschule Phorugh/Meched abgelegt.

Seit Sommersemester 1958 studierte ich in der  
Johannes-Gutenberg-Universität Mainz Medizin.

Im Januar 1964 bestand ich mein Staatsexamen  
und nach Beendigung der Medizinalassistenten -  
zeit möchte ich in der Universitäts-Augenklinik  
in Mainz mich für Augenheilkunde spezialisieren.





